

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

THERAPIEBEDINGTE ÄNDERUNGEN DER
ZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINFRAKTIONEN
VLDL, LDL UND HDL BEI
HYPERLIPOPROTEINÄMIE TYP II.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÜRGEN BÄTCHER

aus Göppingen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

THERAPIEBEDINGTE ÄNDERUNGEN DER
ZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINFRAKTIONEN
VLDL, LDL UND HDL BEI
HYPERLIPOPROTEINÄMIE TYP II.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÜRGEN BÄTCHER
aus Göppingen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

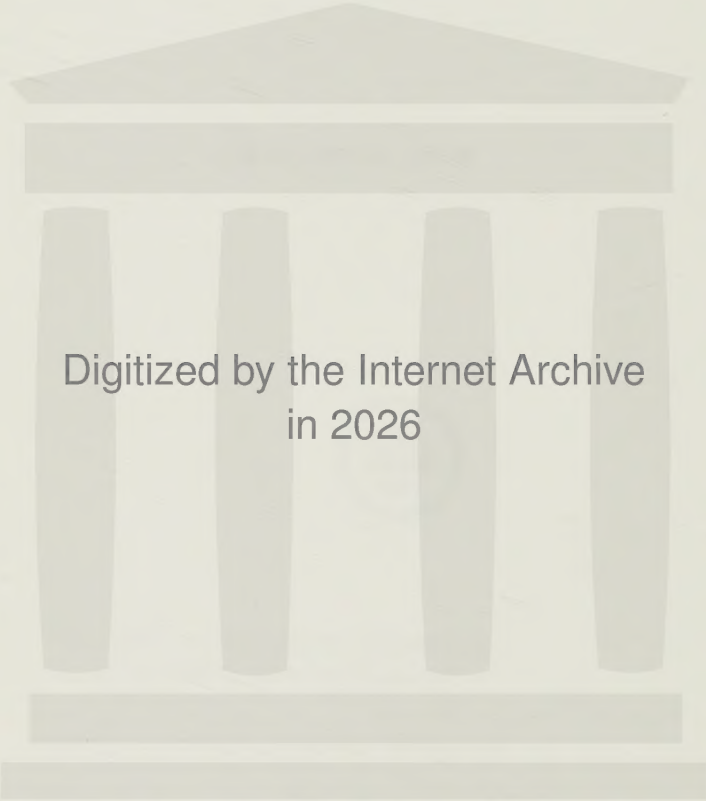


Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27.05.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent:	Dr. med. habil. J. Schneider
Correferent:	Prof. Dr. med. dent. H.F.M. Schmidt

MEINEN ELTERN GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

Abkürzungen und Bezeichnungen

A. Einleitung	1
B. Methodik	4
I. Patienten	4
II. Blutentnahme und Plasmagewinnung	4
III. Präparative Ultrazentrifuge	4
1. Grundlagen	4
2. Lipoproteine	5
3. Übliches Vorgehen bei der Ultrazentrifugation der Serumlipoproteine und eigene Untersuchungen dazu	5
4. Vorgehen bei der Ultrazentrifugation der Serum-LP im Detail	11
4.1. Herstellung von Salzlösungen mit verschiedener Dichte	11
4.2. Präparation	11
IV. Technische Daten, verwendete Geräte, Lipidbestimmungen	12
V. Bestimmung des Cholesterins	13
1. Prinzip	13
2. Reagenzien	14
3. Durchführung	14
VI. Bestimmung der Triglyceride	15
1. Prinzip	15
2. Reagenzien	15
3. Durchführung	15
VII. Bestimmung der Phosphatide	16
1. Prinzip	17
2. Chemikalien	17
3. Reagenzien	17
4. Durchführung	17
VIII. Statistik	19

C. Ergebnisse

I. Cholesterin	21
1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte ..	21
1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde (Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)	21
1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde (Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)	21
II. Triglyceride	22
1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte ..	22
1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde (Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)	22
1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde (Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)	22
III. Phosphatide	22
1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte ..	22
1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde (Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)	22
1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde (Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)	23
IV. t-Test vom Vergleich der beiden Patientenkollektive (Tibrinsäure - Clofibrat) bezüglich ihrer prozentualen Veränderungen; keine Signifikanzen	23
1. Wirkung auf Cholesterin	23
2. Wirkung auf Triglyceride	24
3. Wirkung auf Phosphatide	24
D. Diskussion	32
E. Zusammenfassung	34
Literaturverzeichnis	35

Abkürzungen und Bezeichnungen

ADP	= Adenosindiphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
GK	= Glycerinkinase
HDL	= high density lipoproteins Lipoproteine mit hoher Dichte
HLP	= Hyperlipoproteinämie
LDL	= low density lipoproteins Lipoproteine mit niedriger Dichte
LP	= Lipoprotein
NAD	= Nikotinamiddinucleotid
NADH ₂	= Nikotinamiddinucleotid reduziert
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PK	= Pyruvatkinase
P/S-Quotient	= polyunsaturated/saturated = Verhältnis der mehrfach ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren. Es geht hervor, daß bei einem P/S-Quotienten > 1 der Anteil der ungesättigten Fettsäuren den der gesättigten übersteigt.
S _f	= Flotationskonstante
TG, TGL	= Triglyceride
UPM	= Umdrehungen pro Minute
UZ	= Ultrazentrifuge
VLDL	= very low density lipoproteins Lipoproteine mit sehr geringer Dichte

A. Einleitung

Heute gelten die Hyperlipoproteinämien neben Hypertonie und Nikotinabusus zu den Risikofaktoren erster Ordnung für die Entstehung degenerativer kardiovaskulärer Erkrankungen. (28)

KANNEL et al. (29) meinen sogar, daß die Hyperlipoproteinämie als der wichtigste Risikofaktor anzusehen sei.

Retrospektive und prospektive Studien - beispielsweise FRAMINGHAM (29, 30, 31), ALBANY-HEART-STUDY (7) u.a. - bestätigten allgemein die Hypercholesterinämie als Risikofaktor. Obwohl weniger ausführliche Ergebnisse über die Bedeutung der Hypertriglyceridämie vorliegen, sprechen doch retrospektive Studien (ALBRINK et al. (1)) sowie prospektive Untersuchungen (CARLSON und BÜTTIGER (10)) für den Risikofaktor Hypertriglyceridämie (28).

Bei der Mehrzahl der Studien, die sich mit Lipoproteinsenkern befassen, fällt auf, daß dabei nur die Veränderung des Gesamtcholesterins bzw. der Gesamtriglyceride Beachtung findet. "Da die Konzentrationen der drei Hauptlipoproteinklassen, VLDL, LDL und HDL, welche im Serum alle Hauptfettkomponenten, wie Cholesterol, Triglyceride und Phosphatide enthalten, unabhängig voneinander variieren können, scheint es unmöglich, Veränderungen in den einzelnen LP-Klassen einschätzen zu können, wenn nur Messungen des Gesamt-Serumcholesterins oder der Serumtriglyceride vorgenommen werden. Tatsächlich können ein oder zwei der LP-Klassen gestiegen sein, selbst wenn z.B. das Gesamtcholesterin während der Behandlung gesunken ist." (9)

CARLSON (9) hält für die primäre oder sekundäre Prävention der ischämischen Herzkrankheiten bei Patienten mit abnormen Lipoproteinen folgende Änderungen der Serumkonzentrationen der drei Hauptlipoproteinklassen bei der Therapie für wünschenswert:

VLDL: Erniedrigen oder wenn niedrig: keine Änderung

LDL : Erniedrigen oder wenn niedrig: keine Änderung

HDL : Erhöhen oder wenn hoch: keine Änderung

CARLSON (9) stellte fest, daß beispielsweise bei Hyperlipoproteinämie Typ IV (hohe VLDL, meist niedrige LDL) nach diätetischer und medikamentöser Clofibrat-Behandlung die Cholesterinwerte in den VLDL sanken, aber generell die Cholesterinwerte der LDL über die kritische Schwelle von 138 mg % anstiegen, was ein unerwünschter Effekt ist.

Nicht nur Verlagerungen von Cholesterin innerhalb VLDL und LDL sind als medikamentöser Effekt von Interesse, sondern neuerdings auch solche in den HDL: MILLER und MILLER (37) nehmen an, daß eine Verminderung der Plasma HDL-Konzentration die Entwicklung der Atherosklerose und somit KHK (koronare Herzkrankheiten) beschleunigen kann.

Eine neuere Untersuchung von CAREW et al. (8) bestätigt diesen Zusammenhang. CAREW et al. schreiben den HDL in ihren Versuchen an glatten Muskelzellen der Arterienwand des Schweins folgende Rollen zu:

1. Abtransport von Cholesterin aus den Zellen;
2. Bindung von HDL an die Oberfläche von glatten Muskelzellen (Schwein) ebenso effektiv wie LDL, aber
3. HDL wird weniger schnell aufgenommen und abgebaut als LDL.

Die Anwesenheit von HDL verhindert teilweise die Aufnahme und den Abbau von LDL, und vor allen Dingen unterdrückt es teilweise das durch LDL induzierte Ansteigen des Cholesterins in Zellen. Demnach kann hohen Plasma HDL-Konzentrationen ein präventiver Effekt zur Atherogenese zugeschrieben werden.

Auch STEIN und STEIN (49) fanden jüngst, daß hohe HDL-Konzentrationen LDL am Eintritt in die Gefäßwand hindern.

Neben der absoluten Absenkung erhöhter Cholesterin - und Triglyceridwerte im Serum muß also nach neueren Erkenntnissen der Arterioskleroseforschung auch auf qualitative Veränderungen der verschiedenen LP Wert gelegt werden. Aus diesem Grunde werden die LP bei Patienten mit HLP Typ II unter Behandlung mit dem seit langem im Handel befindlichen Standardtherapeutikum Clofibrinsäure und der der Clofibrinsäure verwandten Tibrinsäure untersucht.

BIELMANN (5) hatte Erfolg mit Tibrinsäure bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ IV (FREDRICKSON et al. (20)), denen er Dosen über 1 000 mg/die verabreichte. Die durchschnittliche Senkung der TG-Werte betrug mehr als 30 %. Bei dieser Gruppe wurde eine geringfügige Senkung des Cholesterinspiegels um 5 % beobachtet.

NOSEDA und SIRTORI (38) verabreichten 31 Patienten mit verschiedenen Hyperlipoproteinämien und einem gesunden Probanden täglich 1 000 - 1 500 mg Tibrinsäure. Bei den Patienten mit HLP Typ IV konnten die Serum-TG-Werte und Serum-Cholesterin-Werte signifikant gesenkt werden. Bei mittleren Typ II a beobachteten sie eine signifikante Senkung von Serumcholesterin, bei Typ II b keine signifikante Senkung von Serum-TG und Cholesterin

sowie bei gesunden Patienten keine Änderung der Serumlipidwerte.

Die Lipidkomponenten der Hauptdichteklassen der Serumlipoproteine VLDL, LDL und HDL wurden analysiert unter rein diätetischer Behandlung (P/S-Quotient über 1,6, Cholesterinzufuhr unter 300 mg/die) sowie nach zwei 6-wöchigen Therapieperioden mit Clofibrinsäure oder Tibrinsäure in alternierender Patientenreihe.

B. Methodik

I. Patienten

Aus der Lipidsprechstunde der medizinischen Universitätspoliklinik Marburg/L. wurden zehn Patienten ausgewählt, bei denen eine Hyperlipoproteinämie Typ II a oder II b (Lipidwerte und Lipoproteinelektrophorese) diagnostiziert worden war. Die Patienten waren den behandelnden Ärzten bekannt und unter regelmäßiger Kontrolle der Lipidambulanz. Sie wurden zur namenlosen Identifizierung mit den Nummern I bis X versehen und in zwei Gruppen zu je fünf Personen eingeteilt (I - V und VI - X).

Nach einer vierwöchigen Medikamentenpause ohne Änderung der Diätvorschriften wurden die Patienten wieder einbestellt. Die Patienten mit den Nummern I, III, V, VII, IX erhielten Tibrinsäure in einer täglichen Dosis von 1 500 mg (drei Einzeldosen zu je 500 mg); die Patienten mit geraden Nummern (II, IV, VI, VIII, X) erhielten Clofibrat in gleicher Form und Dosierung. Beide Gruppen nahmen die Medikamente über einen Zeitraum von 12 Wochen ein. Die üblichen Laborkontrollen erfolgten nach 6 und 12 Wochen, wobei zusätzlich Blut entnommen wurde für die Auftrennung der LP in der Ultrazentrifuge.

II. Blutentnahme und Plasmagewinnung

Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn der Untersuchung und nach 6 und 12 Wochen, morgens nach etwa 12-stündiger Nahrungskarenz.

Zur Verhinderung der Gerinnung wurde das Blut in heparinisierte Röhrchen gefüllt; die Proben wurden längstens 30 Minuten lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufgehoben und dann bei $+20^{\circ}\text{C}$ 10 Minuten lang bei 3 000 UPM zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abgesaugt und in Reagenzgläsern bis zur Weiterverarbeitung in der UZ bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

III. Präparative Ultrazentrifuge

1. Grundlagen

In der Ultrazentrifuge können Partikel mit sehr geringem Dichteunterschied voneinander getrennt werden: unter dem Einfluß der Zentrifugalbeschleunigung (Winkelgeschwindigkeit im Quadrat mal Abstand $\times$ von der Rotationsachse) wandern in Lösung befindliche Teilchen im erreichten Schwerfeld vom Rotationsmittelpunkt weg, d.h. sie sedimentieren.

Mit zunehmender Zeitdauer stellt sich ein Ausgleich zwischen den Dichten der Teilchen und der sie umgebenden Lösung ein.

Der entscheidende Anstoß zur Verwendung der UZ bei der Analyse und später bei der präparativen Trennung der Lipoproteine ging 1949 von der Arbeitsgruppe um John W. GOFMAN aus. Das technische und methodische Konzept der UZ hatte SVEDBERG geschaffen. GOFMAN übernahm die physikalische Dimension, in welcher die Wanderungsgeschwindigkeit zentrifugierter Teilchen vom Rotationsmittelpunkt weg beschrieben wird (Sedimentationskonstante S , S = SVEDBERG Einheit) und erweiterte sie durch den Begriff der Flotation. Dies ist eine zur Sedimentationsrichtung entgegengesetzte Bewegung, die unter gleichen Bedingungen (Zentrifugalkraft, Temperatur, Lösungsmittel) dann zustande kommt, wenn die (LP-) Moleküle spezifisch leichter als die Suspensionslösungen sind. (52)

2. Lipoproteine

Ausgehend von den grundlegenden Arbeiten von GOFMAN (21, 22) und DeLALLA (33) teilt man die Lipoproteine heute in vier Dichtebereiche (von $D = 0,9$ bis $1,21$ g/ml) ein. Die Lipide umfassen einen Dichtebereich von $D = 0,88$ bis $0,90$ g/ml und die Proteine von $D = 1,30$ bis $1,35$ g/ml. Da die Lipoproteine aber bei der Ultrazentrifugation kein kontinuierliches Spektrum einnehmen, sondern Konzentrationsmaxima und -minima ausbilden, letztere gelten als Grenzdichten der Lipoproteine, benutzt man bei der präparativen UZ Lösungen mit diesen Grenzdichten, um die einzelnen Lipoproteinklassen voneinander zu trennen (Sediment und Flotat). Lipoproteinelektrophoretisch entsprechen die VLDL ($D = 0,9$ bis $1,006$ g/ml) den Chylomikronen und prä- β LP, die LDL ($D = 1,006$ bis $1,063$ g/ml) den β -LP und die HDL ($D = 1,063$ bis $1,21$ g/ml) den α -LP. LDL und HDL bilden noch je zwei Untergruppen. Chylomikronen ($D = 0,90$ bis $0,94$ g/ml) wandern bei der Elektrophorese nicht; sie bleiben am Start stehen.

3. Übliches Vorgehen bei der Ultrazentrifugation der Serumlipoproteine und eigene Untersuchungen dazu

Die Abb. 1 und 3 verdeutlichen das übliche Vorgehen bei der fraktionierten Ultrazentrifugation nach UNDEUTSCH (52). Es zeigt sich, daß die Methode sehr zeitaufwendig ist, d.h. man benötigt mindestens drei Tage für die Ultrazentrifugation, um die einzelnen Fraktionen rein darzustellen.

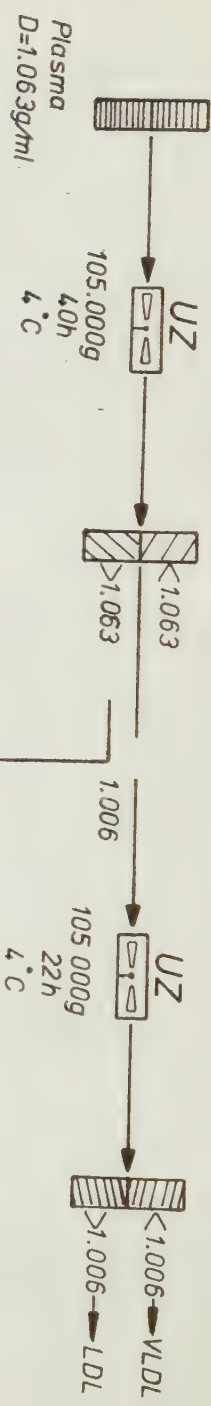


Abb.2

EIGENE METHODE

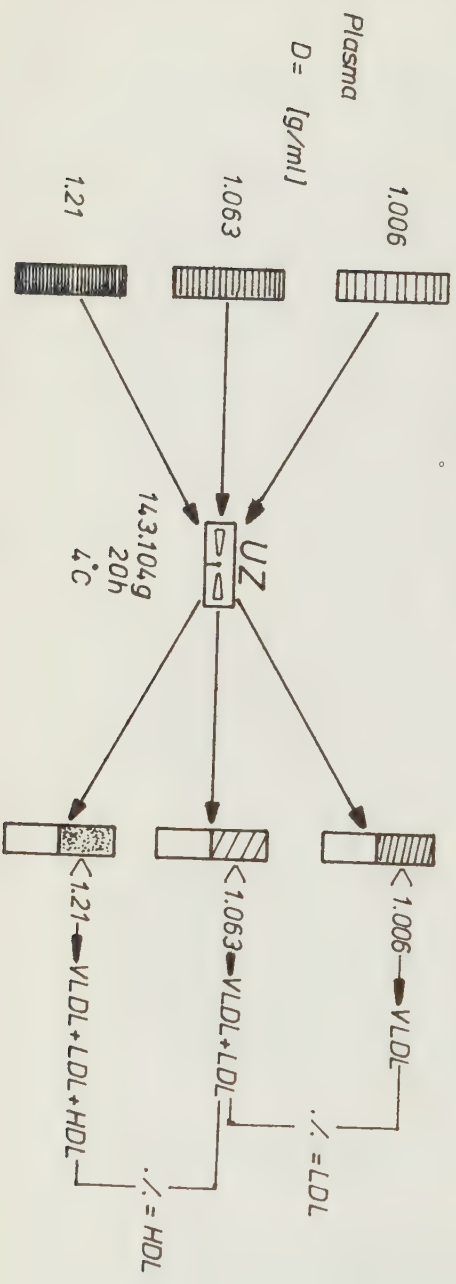
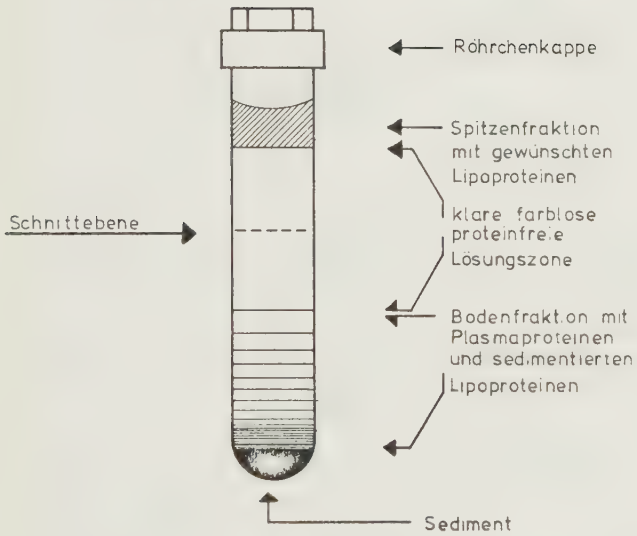


Abb.3



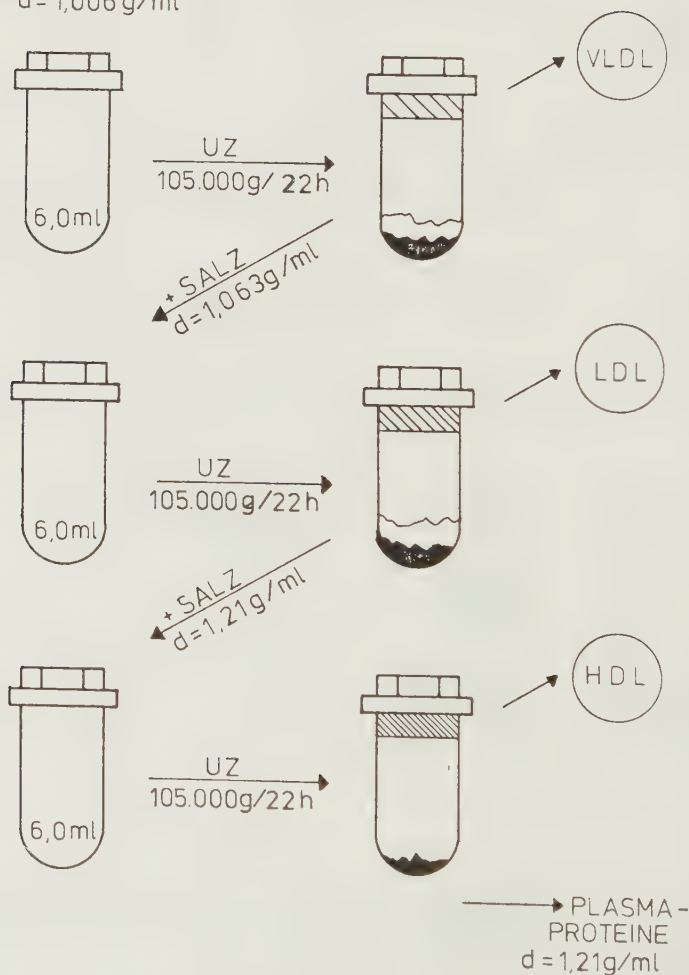
Verteilung der Plasmakomponenten in einem Zentrifugenröhrchen nach einem präparativen Ultrazentrifugenlauf.

Abb. 4

PLASMA

d = 1,006 g/ml

Reindarstellung der einzelnen LP-Klassen



Isolierung der Plasmalipoproteinfractionen mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (UZ).

Bei der UZ bilden sich drei Phasen (vgl. Abb. 3):

1. eine überstehende trübe Phase (weiß oder gelb; ist abhängig von der Dichte, bei der zentrifugiert wurde) = Flotat
2. eine unterstehende klare, gelb gefärbte Phase = Sediment
3. eine breite klare Zwischenphase = Salzlösung.

Mit Hilfe einer Schneidevorrichtung (vgl. Abb. 5) wird nun das Flotat vom Sediment getrennt, indem man innerhalb der klaren Zwischenphase schneidet. Z.B. UZ D = 1,006, Flotat = VLDL, Sediment = LDL + HDL + Proteine.

Will man nun das Sediment weiter zentrifugieren, um die LDL von den HDL zu trennen (D = 1,063), so muß man das Sediment aus dem geschnittenen Zentrifugenröhrchen in ein neues überführen, es auf die gewünschte Dichte bringen und neu zentrifugieren.

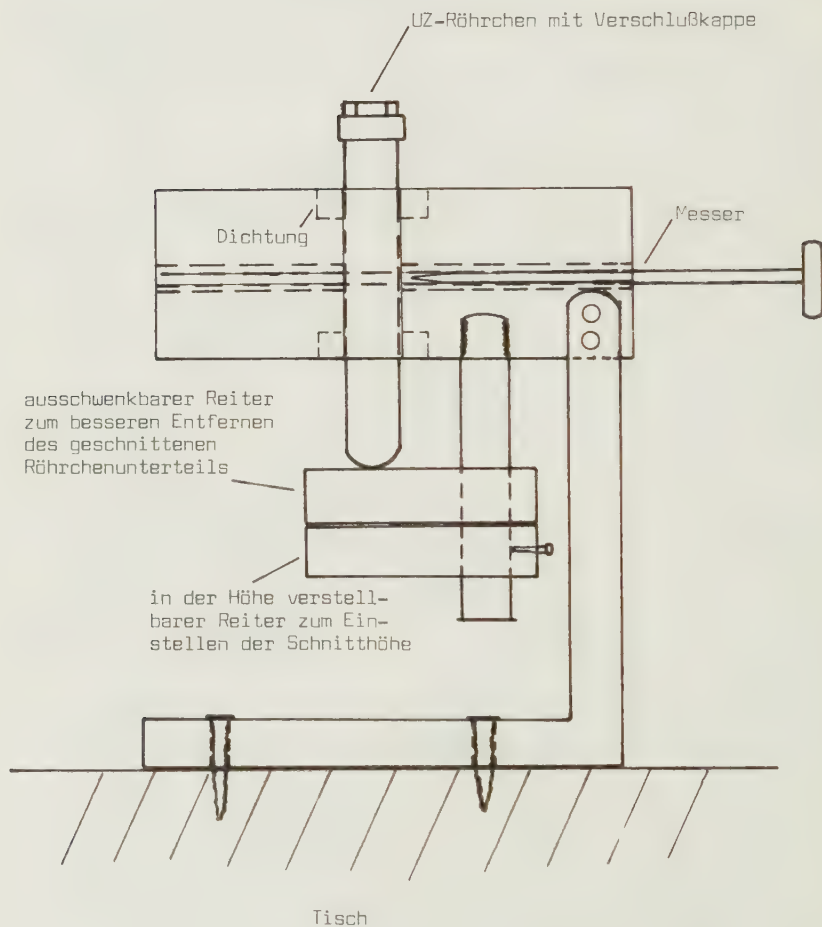
Bei der beschriebenen Standardmethode ist es vor allem bei Seren mit hohen Cholesterinwerten wegen der hohen Viskosität des Sediments bei Lauf 1 und 2 schwierig, die sedimentierten LP in neue UZ-Röhrchen zu überführen. Es wurde deshalb vor Beginn der Untersuchung in Anlehnung an KLEMENS (32) ein anderer Analysengang ausgearbeitet und sowohl an normalen wie auch pathologischen, d.h. hyperlipoproteinämischen Seren erprobt.

Wir führten mit Mischplasmen (Plasma verschiedener Patienten wird zusammengeschüttet) Versuche nach der üblichen Methode der fraktionierten Ultrazentrifugation durch und errechneten die Wiederfindungsraten (Konzentration von TG, Cholesterin, Phosphaten im Gesamtplasma gegenüber den addierten Konzentrationswerten aus den einzelnen LP-Fraktionen). Dabei war die durchschnittliche Verlustquote ≥ 18 %.

Die eigene Modifikation besteht darin, daß wir in einem Arbeitsgang (vgl. Abb. 2) das Plasma in drei Röhrchen bei D = 1,006 (Flotat VLDL), D = 1,063 (Flotat VLDL + LDL), D = 1,21 (Flotat VLDL + LDL + HDL) zentrifugierten. In den isolierten Fraktionen wurden die Konzentrationen von TGL + Cholesterin + Phosphat bestimmt, außerdem vom Plasma. Die Verlustquote war wesentlich geringer und war im Durchschnitt ≥ 4 %. Die außerdem von den einzelnen Phasen angefertigten LP-Elektrophoresen bestätigten die Resultate der Fraktionen bzw. das Fehlen von LP in der reinen Dichtelösung. Bei besserer Ausbeute verringerte sich auch der Zeitaufwand beträchtlich (kein Wiegen, kein Errechnen der Salzlösung, etc.).

Abb. 5

Schemazeichnung des Röhrenchschneidegeräts
von Fa. RANDOLPH & RYAN No. 21a



4. Vorgehen bei der Ultrazentrifugation der Serum-LP im Detail

4.1. Herstellung von Salzlösungen mit verschiedener Dichte

Stammlösung nach HAVEL (24): 153,0 g NaCl + 354,0 g KBr ad 1 000 ml aqua bidest. ergibt eine Lösung mit der Dichte $D = 1,346$ g/ml. Lösungen niedrigerer Dichte erhält man, wenn man obige Standardlösung mit 0,15 M NaCl Lösung (= 8,767 g NaCl ad 1 000 ml aqua bidest., $D = 1,005$) nach folgender Formel verdünnt:

$$V_S \cdot D_S + V_X \cdot D_X = (V_S + V_X) D_M$$

V_S = Volumen des Serums (ml)

D_S = Dichte des Serums ($D = 1,006$ g/ml)

V_X = Volumen der Salzlösung

D_X = Dichte der Salzlösung

D_M = Dichte der Mischung

oder nach V_X aufgelöst
$$V_X = \frac{V_S (D_M - D_S)}{D_X - D_M}$$

Die Salzlösungen müssen stets gut verschlossen gehalten werden, da sich durch Verdunstung die Dichte ändert.

4.2. Präparation

Vor der Präparation in der UZ hatten die Seren (Plasmen) nicht länger als 72 Stunden bei $+4^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gestanden. In einem Arbeitsgang wurden maximal 6 Plasmen auf einmal getrennt.

Von jedem Patientenserum wurden drei gekennzeichnete Zentrifugenröhrchen (siehe technische Angaben) mit je 2 ml Plasma beschickt. Das Röhrchen zur Gewinnung der VLDL wurde mit 4 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung ($D = 1,006$) überschichtet, VLDL + LDL mit 0,4 ml Lösung ($D = 1,346$) und 3,6 ml Lösung ($D = 1,063$), VLDL + LDL + HDL mit 3 ml Lösung ($D = 1,346$) und 1 ml Lösung ($D = 1,21$). Die Lösungen wurden nach der o.a. Formel errechnet und hergestellt. In jedem Röhrchen befanden sich genau 6 ml Plasma-Salzlösung einer bestimmten Dichte. Nach dem Verschließen der Röhrchen wurde damit ein auf $+4^\circ\text{C}$ vorgekühlter Festwinkelrotor (siehe technische Angaben) beschickt (maximal 18 Röhrchen) und genau austariert.

Eine Viertelstunde vor Beginn jedes Laufs wurde die Zentrifugenkammer auf $+4^\circ\text{C}$ vorgekühlt. Diese Temperatur wurde bis zum Ende des Laufs nach 20 Stunden und 40 000 UPM (relative centrifugal force $RCF_{\max} = 143\ 104$ g) beibehalten.

Danach wurden die Zentrifugenröhrchen mit Hilfe eines speziellen Abziehers vorsichtig aus dem Rotor entfernt und mit dem Schneidegerät (vgl. Abb. 5) in der klaren Phase durchschnitten. Die Hälfte mit dem Sediment wurde verworfen. Die Hälfte mit dem Flotat wurde vorsichtig in ein geeichtes 5 ml Erlenmeyerkölbchen gegossen. Anschließend wurde das Oberteil des Zentrifugenröhrchens mit 0,9 %iger NaCl-Lösung so lange nachgespült, bis sich im Kölbchen genau 5 ml Lösung (Flotat + NaCl-Lösung) befanden.

Durch dieses Nachspülen können die eventuell noch an den Wänden bzw. am Deckel des UZ-Röhrchens haftenden Partikel gewonnen werden. Daraufhin wurde die Bestimmung der Triclycerid-, Cholesterin- und Phosphatidkonzentrationen von den erhaltenen Fraktionen und vom Plasma vorgenommen. Dabei muß die bei den Fraktionen entstandene Verdünnung von 5 ml (Flotat) zur Ausgangsmenge 2 ml Plasma berücksichtigt werden, d.h. die Werte müssen mit dem Verdünnungsfaktor $\frac{5}{2}$ multipliziert werden.

IV. Technische Daten, verwendete Geräte, Lipidbestimmungen

Ultrazentrifuge: BECKMANN, Modell L5-50

Zentrifugenröhrchen: BECKMANN, Cellulose Nitrate Tubes
(1/2 Zoll x 2 1/2 Zoll), No. 302232,
Volumen pro Röhrchen = 6,5 ml
Röhrchendurchmesser = 1,3 cm
Röhrchenlänge = 6,4 cm

Verschlußkappen: BECKMANN

Röhrchenschneidevorrichtung: RANDOLPH & RYAN, No. 210

Rotor: BECKMANN, Festwinkelrotor, Typ 40.3

UPM max 40 000

Maximale "Relative Zentrifugalbeschleunigung" (RZB)

bei $r_{\min} = 4,8 \text{ cm} = 85 \text{ 856 g}$

$r_{\text{mittel}} = 6,4 \text{ cm} = 114 \text{ 480 g}$

$r_{\max} = 8,0 \text{ cm} = 143 \text{ 104 g}$ (Werksangaben)

$(\text{RZB} = 1 \text{ 118} \cdot r \cdot (\text{UPM})^2 \cdot 10^{-8})$

Winkel zwischen Rotorbohrung und Rotationsachse (α) = 20° ;

Anzahl der Bohrungen = 18

Cholesterin: Biochemica-Test-Combination

"Cholesterinenzymatischer Farb-Test"

Best.-Nr. 15738 (180 Bestimmungen)

Fa. BOEHRINGER MANNHEIM GmbH

Triglyceride: Biochemica-Test-Combination

"Triglyceride vollenzymatisch (Neutralfett)"

Best.-Nr. 15725 (4 x 90 Bestimmungen)

Fa. BOEHRINGER MANNHEIM GmbH

Die Messungen der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen wurden am Substratmeßplatz 5091 der Fa. EPPENDORF, Hamburg, bestehend aus

Digitalphotometer 6115 S

Probentisch 5122

Drucker 6522

Registrierweiche 6442

Schlauchpumpe 5260

durchgeführt. Dabei wurden vom Drucker die endgültigen Werte in mg % ausgedruckt, nachdem automatisch die Proben im Digitalphotometer durchgemessen wurden.

Pipettiert wurde größtenteils mit dem EPPENDORF Probe-Reagenz-Dosierer 5231 in EPPENDORF Mikroreaktionsgefäße.

V. Bestimmung des Cholesterins

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von P. RÜSCHLAU et al. (41) an.

1. Prinzip

Die im Serum vorkommenden Cholesterinester werden durch Cholesterinesterase gespalten. Das entstandene freie Cholesterin wird durch Cholesterinoxidase unter Sauerstoffverbrauch zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid oxydiert.



Das entstandene Wasserstoffperoxid oxydiert mit Hilfe des Enzyms Katalase Methanol zu Formaldehyd. In Gegenwart von Ammoniumionen bildet Formaldehyd mit Azetylazeton eine gelbe Verbindung, deren Farbintensität der Cholesterinkonzentration proportional ist und zwischen 405 - 414 nm gemessen wird.

2. Reagenzien

Lösung 1: 0,6 M Ammoniumphosphat-Puffer pH 7;

1,7 M Methanol; Katalase $\geq$ 700 U/ml

Lösung 2: 0,42 M Azetylazeton; 2,5 M Methanol;

2,1 %ige Hydroxypolyäthoxydodecan

Lösung 3: Cholesterinesterase $\geq$ 7 U/ml

Lösung 4: Cholesterinoxidase $\geq$ 4 U/ml

Lösung 5: Cholesterinreagenz wird aus den Lösungen 1 + 2 + 3

im Verhältnis 100 : 5 : 0,4 hergestellt

Die Lösungen 1 - 4 sind bei + 4⁰ C neun Monate haltbar; Lösung 5 ist bei + 4⁰ C einen Monat, bei + 25⁰ C eine Woche haltbar.

3. Durchführung

Es wurde nach der Halbmikromethode, bezogen auf den EPPENDORF-Substratmeßplatz, der Fa. BOEHRINGER vorgegangen. Zunächst müssen die Plasmen bzw. die LP-Fraktionen verdünnt werden. Die durch die Ultrazentrifugation entstandene Verdünnung (Faktor 2,5) haben wir dabei für die Verdünnung der LP-Fraktionen berücksichtigt.

In gekennzeichnete Mikroreaktionsgefäße wurden mit dem EPPENDORF-Probe-Reagenz-Dosierer 50 μ l Plasma + 200 μ l (bei reinem Plasma 500 μ l) NaCl 0,9 % pipettiert und gut gemischt. Daraufhin wurde von jeder verdünnten Probe eine Probe + ein Probenleerwert hergestellt.

Probe: 50 μ l verdünntes Plasma + 1 000 μ l Lösung 5 + 10 μ l Lösung 4

Probenleerwert: 50 μ l verdünntes Plasma + 1 000 μ l Lösung 5

Die beiden Reaktionsgefäße mit Probe und Probenleerwert kamen dann in eine Kette, wobei zu beachten ist, daß die Probe (höhere Extinktion) sich vor dem Probenleerwert (niedrigere Extinktion) befindet. Nachdem die Kette mit den Gemischen auf dem Rüttler nochmals gut durchgemischt wurde, wurde sie für mindestens 60 Minuten im Trockenofen bei + 37⁰ C inkubiert. Danach wurde die Kette auf dem Probentisch eingespannt und vollautomatisch die Extinktion von Probe und Probenleerwert im EPPENDORF-Digitalphotometer (Durchflußküvette) bei Hg = 405 nm bestimmt. Der Nullabgleich wurde automatisch durch aqua bidest. (jedes 11. Kettenglied enthielt ein Reaktionsgefäß mit aqua bidest.) durchgeführt. Bei saldierender Einstellung des Photometers und Eingabe des Faktors F = 1 210 wird die Konzentration des Cholesterins durch den Drucker in mg % ausgewiesen.

$$c = 1\,210 \cdot E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}} \quad [\text{mg \%}]$$

VI. Bestimmung der Triglyceride

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von A.W. WAHLEFELD (4) sowie M. EGGSTEIN, F.H. KREUTZ (17,18) und F.H. SCHMIDT (47) an.

1. Prinzip

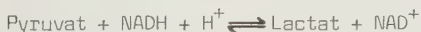
Die Triglyceride (Neutralfette) werden enzymatisch über ihren Glycerin-gehalt bestimmt. Die Spaltung der Triglyceride erfolgt enzymatisch durch die Enzyme Lipase und Esterase. Das entstandene Glycerin wird in der von GK katalysierten Reaktion durch ATP zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert.



Mittels PK wird das entstandene ADP durch PEP unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP übergeführt.



Pyruvat wird durch NADH mittels LDH zu Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD oxydiert wird.



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist äquivalent der Glycerin-Menge. NADH ist Meßgröße und aufgrund seiner Absorption bei Hg 365, Hg 334 nm oder 340 nm leicht zu bestimmen.

2. Reagenzien

Lösung 1: 50 mM Phosphatpuffer; pH 7,0; 4 mM Magnesiumsulfat;
0,35 mM Natrium-Dodecylsulfat

Lösung 2: 10 mM NADH; 22 mM ATP; 18 mM PEP

Lösung 3: LDH $\geq$ 300 U/ml; PK $\geq$ 50 U/ml; Lipase $\geq$ 4 000 U/ml;
Esterase $\geq$ 30 U/ml

Lösung 4: GK $\geq$ 150 U/ml

Lösung 5: Reaktionsgemisch wird aus den Lösungen 1 + 2 + 3
im Verhältnis 100 : 2 : 2 hergestellt

Die Lösungen 1, 3 und 4 sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar; Lösung 2 bei + 4° C zwei Wochen haltbar; Lösung 5 ist bei + 20-25° C acht Stunden, bei + 4° C dreißig Stunden haltbar.

3. Durchführung

Es wurde ebenfalls nach der Halbmikromethode, bezogen auf den EPPENDORF-Substratmeßplatz, der Fa. BOEHRINGER vorgegangen. In die EPPENDORF-Mikroreaktionsgefäße wurden mit dem EPPENDORF-Probe-Reagenz-Dosierer für

die Probe 1 000 µl Lösung 5 + 20 µl Plasma + 5 µl Lösung 4 und für den Probenleerwert 1 000 µl Lösung 5 + 20 µl Plasma pipettiert. Die Reaktionsgefäße kamen dann in eine Kette, wobei darauf zu achten ist, daß sich der Probenleerwert (höhere Extinktion) vor der Probe (abfallende Extinktion) befindet. Nachdem die Kette mit den Gemischen auf dem Rüttler gut durchgemischt wurde, wurde sie ca. 10 Minuten lang bei + 20 - 25° C (Raumtemperatur) stehengelassen. Anschließend wurde die Kette auf dem EPPENDORF-Probentisch eingespannt und vollautomatisch die Extinktion von Probenleerwert und Probe im EPPENDORF-Digitalphotometer bei $\lambda = 366 \text{ nm}$ bestimmt. Zusätzlich wurde der Reagenzienleerwert bestimmt, der behandelt wurde wie Probe und Probenleerwert, anstatt Serum jedoch aqua bidest. pipettiert wurde. Der Reagenzienleerwert muß einmal pro Testpackung bestimmt werden. Der Nullabgleich wurde mit aqua bidest. (siehe Cholesterinbestimmung) durchgeführt. Bei saldrierender Einstellung des Photometers und Eingabe des Faktors $F = 1\,373$ wird die Konzentration des Cholesterins durch den Drucker in mg % ausgewiesen, wobei jedoch von diesem Wert der Reagenzienleerwert abgezogen werden muß sowie bei Bestimmung des reinen Plasmas zur Berücksichtigung des reinen Glycerins 10 mg Triglyceride/100 ml abzuziehen ist. Außerdem mußte bei der Bestimmung der LP-Fraktionen der errechnete Wert mit dem durch die Ultrazentrifugation entstandenen Verdünnungsfaktor $F = 2,5$ multipliziert werden.

Für die Berechnung von Substrat-Konzentrationen (c) gilt allgemein die Formel

$$c = \frac{MG \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot 10 \cdot v} \cdot F \cdot \Delta E \text{ (mg/100 ml)}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH; d = Schichtdicke der Küvette; MG = Molekulargewicht der Serum-Triglyceride (875 g/mol); F = Verdünnungsfaktor; V = Summe der im Pipettierschema angegebenen Volumina; v = Volumen des Probenmaterials; ΔE = Extinktionsdifferenz.

Bezogen auf den EPPENDORF-Substratmeßplatz beträgt $c = 1\,373 \cdot \Delta E$ (mg/100 ml).

VII. Bestimmung der Phosphatide

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte über die Phosphoranalyse nach BARTLETT (3); die Veraschung wurde nach ALLEN (2) und die Extraktion der Lipide nach der Methode von FOLCH (19) durchgeführt.

1. Prinzip

Nach der Bestimmung des Lipidphosphors im FOLCH-Extrakt durch Veraschung und anschließender Entwicklung von Phosphormolybdänblau berechneten wir den Phosphatidgehalt über die Extinktion im ZEISS-Spektralphotometer.

2. Chemikalien

Chloroform DAB 6

Methanol p.a.

Natriumchlorid p.a.

Perchlorsäure (70 %ig) p.a.

Ammoniummolybdat p.a.

Natriumsulfit p.a.

1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure p.a.

Natriumpyrosulfitsäure p.a.

Kaliumhydrogenphosphat p.a.

3. Reagenzien

Ammoniummolybdat 0,22 %ig (1,1 g ad 500 ml aqua bidest.)

Phosphorreagenz:

Zu 200 ml frischangesetzter 13,7 %iger Natriumpyrosulfitlösung wurden 0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure und 2 g wasserfreies Natriumsulfit unter Umrühren gegeben. Die Lösung wurde filtriert, in einer dunklen Flasche aufbewahrt und alle zwei Wochen erneuert.

Anorganischer Phosphorstandard:

0,3509 g des vorgetrockneten Kaliumhydrogenphosphats wurden in einem 1-Liter-Meßkolben gelöst, 10 ml 1.0N Schwefelsäure zugegeben und mit aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt. Diese Stammlösung enthält in 5 ml 0,4 mg Phosphor und ist unbegrenzt haltbar.

4. Durchführung

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Extraktion der Lipide wurden 0,5 ml Plasma und 16 ml Chloroform mit Methanol auf 25 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit wurden 20 ml des Filtrats in einen Schütteltrichter gegeben und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln ließen wir die Lösung für 30 Minuten zum Absetzen der Chloroformphase stehen und filtrierten diese anschließend in ein Schliffgläschen.

Anorganisches Phosphat des Plasmas bleibt in der Salz-Wasser-Methanolphase zurück. Der aus den Phosphatiden stammende Phosphor befindet sich in der Chloroformphase.

Anschließend wurden jeweils 0,5 ml des Filtrats bei + 70° C für 5 - 10 Minuten eingedampft. Danach wurde in jedes Glas 0,4 ml 70 %ige Perchlorsäure pipettiert, entsprechend auch in ein weiteres Reagenzglas zur Ermittlung des Leerwerts. Die Proben und der Leerwert wurden dann im Sandbad bei + 180° C eine Stunde lang verascht. Nach dem Erkalten erfolgte die Zugabe von 4,6 ml einer 0,22 %igen Ammoniummolybdatlösung und von 0,2 ml Phosphorreagenz. Nach gutem Schütteln wurden die Reagenzgläser für 7 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, anschließend abgekühlt und die Extinktionen der Proben gegen den Leerwert im ZEISS-Spektralphotometer bei 830 nm und einer Schichtdicke der Quarzküvetten von 1 cm bestimmt.

In jeder Serie wurde ein Standardwert mitgeführt. Die Standardlösung (2,5 ml) wurde auf 50 ml mit aqua bidest. verdünnt. 0,5 ml dieser Verdünnung gingen als "Tagesphosphorstandard" entsprechend der Probe in den Arbeitsgang ein.

Berechnung:

Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz gilt:

$$\frac{C_p}{C_{St}} = \frac{E_p}{E_{St}} \quad (F_3)$$

C_p = Konzentration der Probe

C_{St} = Konzentration des Standards

E_p = Extinktion der Probe

E_{St} = Extinktion des Standards

Daraus folgt:

$$C_p = \frac{E_p \cdot C_{St}}{E_{St}} \quad (F_4)$$

Wegen der Verdünnung der Serumproben bei der Extraktion gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt:

$$\text{Phosphor/ml Serum} = \frac{E_p}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \quad (F_5)$$

in mg/100 ml ausgedrückt:

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_p}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1 \quad (F_6)$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt multipliziert mit 25, was einem Phosphorgehalt von 4 % entspricht und nur einen Näherungswert darstellt (ZÖLLNER und KIRSCH (55)). Außerdem muß bei der Bestimmung der LP-Fractionen der bei der Ultrazentrifugation entstandene Verdünnungsfaktor $F = 2,5$ berücksichtigt werden (errechnete Werte $\cdot 2,5$).

VIII. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden im Rechenzentrum der Universität Marburg/L. durchgeführt.

Zunächst wurden die Meßwerte aus den einzelnen UZ-Läufen getrennt nach den beiden Patientenkollektiven (Tibrinsäure, Clofibrat) jeweils mit Hilfe des t-Tests für abhängige Stichproben miteinander verglichen.

Der t-Test (44) dient zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer Mittelwerte, wobei die Differenzen der zusammengehörigen Meßwerte normal verteilt sein müssen.

Zu jedem zusammengehörigen Meßwertpaar wird die Differenz d gebildet. Anschließend wird die Prüfgröße t gemäß der Formel

$$t = \frac{\sum d}{\sqrt{\frac{n \cdot \sum d^2 - (\sum d)^2}{n - 1}}}$$

bestimmt, wobei n die Anzahl der Meßwertpaare aus beiden Stichproben ist.

Die Größe t ist STUDENT - verteilt mit $n - 1$ Freiheitsgraden. Aus t und der Anzahl der Freiheitsgrade berechnet sich die Irrtumswahrscheinlichkeit dafür, daß die Stichproben aus verschiedenen Grundgesamtheiten entstammen. Von signifikanten Unterschieden kann man sprechen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5 \%$ ist (Vereinbarung).

Die Mittelwertberechnung wurde nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

durchgeführt. Die Streuung des Mittelwerts erhält man durch Anwendung der Formel

$$S_m = \frac{S_e}{\sqrt{n}},$$

wobei S_e - die Streuung der Einzelwerte - aus der Formel

$$S_e = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

hervorgeht.

Anschließend wurden die Mittelwerte der beiden Patientenkollektive mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben verglichen. Der t-Test diente hierbei zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben aus normal verteilten Grundgesamtheiten hinsichtlich ihrer Mittelwerte (45).

Die Prüfgröße $\bar{t}$ errechnet sich wie folgt:

$$\bar{t} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right] \left[\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]}}$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ Mittelwerte der beiden Gruppen

s_1, s_2 Streuung der beiden Gruppen

n_1, n_2 Stichprobenumfänge

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n}$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2}{n - 1}}$$

Die Freiheitsgrade betragen für den t-Test: $n_1 + n_2 - 2$

Nach der Anzahl der Freiheitsgrade sowie der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit α ist $\bar{t}$ auf dem α -Niveau signifikant, wenn $\bar{t}$ größer als t ist.

t ist aus der Tabelle der Signifikanzschranken der Studententverteilung nach YATES und FISHER zu entnehmen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt hier $\alpha \leq 5\%$.

C. Ergebnisse

I. Cholesterin

1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte

1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde

(Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)

Aufgrund der geringen Anzahl von Probanden ($n = 5$) konnten nur wenige signifikante Änderungen beobachtet werden ($\alpha < 5\%$).

Unter Mittelwerte $\bar{x}$ ist hier das arithmetische Mittel jeweils aus den drei UZ-Läufen dieser Patienten zu verstehen. Somit lassen sich vier Mittelwertkurven entsprechend den Werten vom Plasma und den drei Fraktionen (VLDL, LDL, HDL) erstellen. Tab. 1 S. 25 zeigt die einzelnen Mittelwerte der drei UZ-Läufe sowie den t-Test, der die Mittelwerte der einzelnen Läufe miteinander vergleicht.

In Abb. 6 S. 30 sind die einzelnen Mittelwertkurven dargestellt. Man kann erkennen, daß der Gesamtcholesterinspiegel nach 6 Wochen leicht und nach 12 Wochen stark gestiegen ist. Während der Cholesterinspiegel in den VLDL nach 6 Wochen abgesunken ist, stieg er in den LDL an, um nach weiteren 6 Wochen wieder etwas abzusinken, wobei er in den VLDL wieder stark ansteigt, in den HDL hingegen zunächst fast gleichbleibend ist, aber nach 12 Wochen ist ebenfalls ein Anstieg zu verzeichnen. Signifikanzen ergeben sich nur beim Vergleich der UZ-Läufe 2 mit 3 (Gesamtcholesterin) und 1 mit 2 (VLDL) sowie 2 mit 3 (HDL).

1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde

(Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)

Aus der Tab. 4 S. 27 sowie Abb. 6 S. 30 kann man entnehmen, daß der Gesamtcholesterinspiegel nach 6 Wochen wenig und nach 12 Wochen stärker angestiegen ist. Während der Cholesterinspiegel in den VLDL stetig abfällt, sinkt er in den LDL nach 6 Wochen leicht ab und steigt nach weiteren 6 Wochen stark an. In den HDL steigt er nach 6 Wochen an und fällt nach weiteren 6 Wochen wieder etwas ab. Patient Nr. VI war nach 6 Wochen, die Patienten Nr. IV und X waren nach 12 Wochen nicht zur Kontrolluntersuchung erschienen. Durch diesen Ausfall ergaben sich in dieser Gruppe überhaupt keine Signifikanzen.

II. Triglyceride

1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte

1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde (Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)

In Tab. 2 S. 25 sind die Mittelwerte graphisch veranschaulicht sowie der t-Test, ein Vergleich der Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen. Die Mittelwertkurven sind in Abb. 7 S. 30 dargestellt.

Die Gesamttriglyceridkonzentration fällt nach 6 Wochen stark ab und steigt nach weiteren 6 Wochen um fast das doppelte an. Der Triglyceridspiegel in den VLDL fällt nach 6 Wochen stark ab, steigt in den nächsten 6 Wochen jedoch wieder stark an; in den LDL fällt er nach 6 Wochen leicht ab und hat sich nach 12 Wochen noch kaum verändert. In den HDL fällt er zunächst stark ab und steigt dann, ähnlich den VLDL, stark an. Keine Signifikanzen.

1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde (Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)

Tab. 5 S. 27 zeigt die Mittelwerte und den t-Test, ein Vergleich der Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen. Die Mittelwertkurven gibt Abb. 7 S. 30 wieder.

Hier fällt der Gesamttriglyceridspiegel nach 6 Wochen stark, nach weiteren 6 Wochen nur noch schwach ab. In den VLDL sinkt der TGL-Spiegel während der ganzen Behandlungsdauer stark ab (von 178,8 mg % auf 66 mg %). In den LDL ist zunächst ein leichtes Absinken (nach 6 Wochen), dann wieder ein leichtes Ansteigen (nach 12 Wochen) zu beobachten. In den HDL nach 6 Wochen starker Abfall der TGL-Konzentration, dann fast gleichbleibend mit minimal ansteigender Tendenz. Keine Signifikanzen.

III. Phosphatide

1. Mittelwerte, Mittelwertkurven, t-Test der Mittelwerte

1.1. Patientenkollektiv, das mit Tibrinsäure behandelt wurde (Patienten Nr. I, III, V, VII, IX)

Tab. 3 S. 26 stellt die Mittelwerte und den t-Test dar, Abb. 8 S. 31 zeigt die Mittelwertkurve der Phosphatkonzentrationen.

Der Gesamtphosphatidspiegel sinkt nach 6 Wochen, um dann in den nächsten 6 Wochen über seinen Ausgangswert anzusteigen. Der Phosphatidspiegel in den VLDL fällt nach 6 Wochen stark ab, während er in den LDL ansteigt. Nach weiteren 6 Wochen steigt er in den VLDL wieder an, bleibt jedoch unter seinem Ausgangswert; hingegen steigt er in den LDL weiter an. In den HDL fällt der Phosphatidspiegel nach 6 Wochen leicht ab und steigt nach weiteren 6 Wochen an. Signifikanzen bezüglich der Phosphatidkonzentrationen im Vergleich der UZ-Läufe 1 mit 3 und 2 mit 3 (Gesamtphosphatidkonzentration) sowie Phosphatidkonzentration in den VLDL Lauf 1 mit 2.

1.2. Patientenkollektiv, das mit Clofibrat behandelt wurde
(Patienten Nr. II, IV, VI, VIII, X)

Tab. 6 S. 28 zeigt die Mittelwerte und den t-Test vom Vergleich der Mittelwerte der Phosphatidkonzentrationen. Die Mittelwertkurve ist in Abb. 8 S. 31 dargestellt.

Der Gesamtphosphatidspiegel ist nach 6 Wochen leicht angestiegen und steigt nach weiteren 6 Wochen noch etwas stärker an. In den VLDL fällt der Phosphatidspiegel nach 6 und nach 12 Wochen ab, während er in den LDL zunächst nur leicht, dann stärker ansteigt. In den HDL steigt der Phosphatidspiegel während der ganzen Versuchsdauer fast linear an. Keine Signifikanzen.

IV. t-Test vom Vergleich der beiden Patientenkollektive (Fibrinsäure - Clofibrat) bezüglich ihrer prozentualen Veränderungen; keine Signifikanzen

Tab. 7 S. 29 zeigt den t-Test vom Vergleich der beiden Kollektive. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Anhand der Mittelwertkurven - Abb. 6, 7, 8, S. 30 und 31 - kann man jedoch auf eine teilweise unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Medikamente schließen.

1. Wirkung auf Cholesterin (Abb. 6)

Bei beiden Präparaten steigt der Cholesterinspiegel nach 6 und 12 Wochen an. Während bei Clofibratbehandlung der Cholesterinspiegel der VLDL und LDL nach 6 Wochen absinkt, steigt er nach weiteren 6 Wochen

in den LDL stark an, hingegen sinkt er in den VLDL weiter ab.

Im Gegensatz dazu steigt der Cholesterinspiegel bei Behandlung mit Tibrinsäure in den LDL nach 6 Wochen an, während er in den VLDL fällt; nach weiteren 6 Wochen ist er in den VLDL angestiegen, während er in den LDL leicht abgefallen ist.

2. Wirkung auf Triglyceride (Abb. 7)

Während bei Behandlung mit Tibrinsäure die Gesamttriglyceridkonzentration nach 6 Wochen stark abnimmt, ist sie nach 12 Wochen wieder stark angestiegen. Clofibrat dagegen senkt die Gesamttriglyceride nach 6 und 12 Wochen sowie die TGL-Konzentration in den VLDL. Der TGL-Spiegel in den LDL fällt nach 6 Wochen etwas ab, ist aber nach 12 Wochen wieder angestiegen. Die HDL verändern sich kaum. Die TGL-Konzentration in den VLDL bei Behandlung mit Tibrinsäure verhält sich analog zur Gesamt-TGL-Konzentration, ebenso die der HDL, während die LDL-TGL-Konzentration zwar nur leicht, aber während der ganzen 12 Wochen sinkt.

Demnach scheint Clofibrat eine wesentlich bessere Wirkung auf die Triglyceridkonzentrationen auszuüben als Tibrinsäure.

3. Wirkung auf Phosphatide (Abb. 8)

Beide Medikamente erhöhen den Gesamtphosphatidspiegel nach 12 Wochen. Nur bei Behandlung mit Tibrinsäure sinkt er zunächst nach 6 Wochen ab. Während Clofibrat die Phosphatidkonzentration in den VLDL senkt, steigen sie in den LDL und HDL an. Tibrinsäure senkt nach 6 Wochen den Phosphatidspiegel in den VLDL, aber nach weiteren 6 Wochen steigt er dort wieder an. Die Konzentrationen in den LDL werden während der gesamten Versuchsdauer erhöht, ebenso - aber nur unwesentlich - in den HDL. Auch hier scheinen die Unterschiede in der Wirkungsweise nur unwesentlich zu sein.

Da unsere Ergebnisse keine eindeutige Aussage zulassen, kann nur festgestellt werden, daß eine unterschiedliche Wirkung der beiden Medikamente - wenn überhaupt - lediglich in der Wirkung auf Triglyceride besteht.

Tab. 1: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d.UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	329,4	56,56	1 mit 2	0,10	92,62		ns	5
Ges.	2	333,6	85,96	1 mit 3	1,40	23,31		ns	5
Ges.	3	400,8	98,79	2 mit 3	3,21	3,27		s	5
VLDL	1	59,2	40,90	1 mit 2	2,96	4,15		s	5
VLDL	2	30,8	20,08	1 mit 3	1,19	29,85		ns	5
VLDL	3	85,4	63,08	2 mit 3	2,17	9,56		ns	5
LDL	1	205,0	65,56	1 mit 2	1,48	21,43		ns	5
LDL	2	236,6	85,85	1 mit 3	0,34	75,16		ns	5
LDL	3	220,0	140,42	2 mit 3	0,65	55,12		ns	5
HDL	1	65,2	24,86	1 mit 2	0,06	95,58		ns	5
HDL	2	66,2	20,08	1 mit 3	1,90	13,02		ns	5
HDL	3	95,4	11,06	2 mit 3	3,16	3,41		s	5

Tab. 2: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d.UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	301,2	151,56	1 mit 2	1,84	14,01		ns	5
Ges.	2	218,0	71,27	1 mit 3	1,77	15,14		ns	5
Ges.	3	463,0	298,05	2 mit 3	2,31	8,21		ns	5
VLDL	1	198,0	132,84	1 mit 2	1,86	13,65		ns	5
VLDL	2	137,2	63,96	1 mit 3	1,68	16,78		ns	5
VLDL	3	289,4	198,09	2 mit 3	2,35	7,85		ns	5
LDL	1	72,2	30,26	1 mit 2	0,74	50,10		ns	5
LDL	2	62,2	18,93	1 mit 3	0,76	49,13		ns	5
LDL	3	60,2	22,73	2 mit 3	0,36	73,90		ns	5
HDL	1	31,0	8,51	1 mit 2	2,09	10,54		ns	5
HDL	2	18,6	8,29	1 mit 3	2,06	10,86		ns	5
HDL	3	113,4	91,86	2 mit 3	2,35	7,85		ns	5

s = signifikant ($\alpha < 5$)

ns = nicht signifikant

Tab. 3: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Phosphatidkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d. UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	348,4	67,34	1 mit 2	1,31	25,92		ns	5
Ges.	2	323,8	59,74	1 mit 3	3,00	4,01		s	5
Ges.	3	417,8	48,93	2 mit 3	3,78	1,95		s	5
VLDL	1	110,6	17,30	1 mit 2	6,47	0,29		s	5
VLDL	2	38,8	36,27	1 mit 3	0,77	48,35		ns	5
VLDL	3	83,4	87,96	2 mit 3	1,66	17,19		ns	5
LDL	1	115,6	75,39	1 mit 2	0,95	39,82		ns	5
LDL	2	167,8	76,25	1 mit 3	1,78	14,93		ns	5
LDL	3	198,4	47,74	2 mit 3	1,34	25,07		ns	5
HDL	1	122,2	36,42	1 mit 2	0,12	90,72		ns	5
HDL	2	117,2	66,48	1 mit 3	0,40	71,04		ns	5
HDL	3	136,0	59,87	2 mit 3	0,36	73,63		ns	5

Tab. 4: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d.UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	319,4	38,77	1 mit 2	0,89	43,93		ns	4
Ges.	2	330,3	22,72	1 mit 3	1,47	27,83		ns	3
Ges.	3	386,7	106,71	2 mit 3	0,35	78,42		ns	2
VLDL	1	48,6	61,26	1 mit 2	1,07	36,42		ns	4
VLDL	2	36,3	36,94	1 mit 3	0,33	79,54		ns	2
VLDL	3	20,5	12,02	2 mit 3				..	1
LDL	1	229,4	80,12	1 mit 2	0,33	76,45		ns	4
LDL	2	221,3	50,72	1 mit 3	11,20	5,67		ns	2
LDL	3	367,0	63,64	2 mit 3				..	1
HDL	1	41,4	17,11	1 mit 2	2,16	11,91		ns	4
HDL	2	72,8	11,00	1 mit 3	1,62	24,58		ns	3
HDL	3	51,3	5,69	2 mit 3	3,91	15,95		ns	2

Tab. 5: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d.UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	272,0	327,19	1 mit 2	1,02	38,48		ns	4
Ges.	2	209,0	183,01	1 mit 3	0,82	49,84		ns	3
Ges.	3	188,7	83,05	2 mit 3	0,85	55,12		ns	2
VLDL	1	178,8	256,97	1 mit 2	1,02	38,30		ns	4
VLDL	2	136,8	150,30	1 mit 3				..	2
VLDL	3	66,0	32,53	2 mit 3				..	1
LDL	1	67,4	61,57	1 mit 2	0,90	43,28		ns	4
LDL	2	54,8	34,25	1 mit 3	4,07	15,36		ns	2
LDL	3	70,5	26,16	2 mit 3				..	1
HDL	1	32,3	6,90	1 mit 2	1,14	37,17		ns	3
HDL	2	17,5	12,71	1 mit 3	3,50	7,29		ns	3
HDL	3	18,3	12,10	2 mit 3	1,24	43,34		ns	2

Tab. 6: Mittelwerte, t-Test der Mittelwerte der Phosphatidkonzentrationen (mg %)

Frakt.	UZ Lauf	XQ	SE	Vergl. d. UZ L.	t	alpha	Veränd.	s ns	n
Ges.	1	322,0	28,29	1 mit 2	2,98	5,87		ns	4
Ges.	2	338,5	18,50	1 mit 3	2,91	10,07		ns	3
Ges.	3	374,0	22,27	2 mit 3	10,00	6,35		ns	2
VLDL	1	93,0	52,67	1 mit 2	1,83	16,44		ns	4
VLDL	2	52,3	53,95	1 mit 3	1,46	38,29		ns	2
VLDL	3	39,5	37,48	2 mit 3				..	1
LDL	1	182,4	44,17	1 mit 2	0,48	66,27		ns	4
LDL	2	193,3	62,19	1 mit 3	3,18	19,39		ns	2
LDL	3	254,0	35,36	2 mit 3				..	1
HDL	1	46,6	41,45	1 mit 2	1,86	15,98		ns	4
HDL	2	93,0	33,82	1 mit 3	1,30	32,34		ns	3
HDL	3	157,7	122,23	2 mit 3	1,01	49,65		ns	2

Tab. 7: t-Test - Vergleich der beiden Patientenkollektive (Fibrinsäure - Clofibrat) bezüglich ihrer prozentualen Veränderungen

Art	Fraktion	Vergl. d. UZ L.	t	alpha	s ns
Chol.	Ges.	1 mit 2	0,29	78,36	ns
Chol.	Ges.	1 mit 3	0,12	90,72	ns
Chol.	Ges.	2 mit 3	1,23	27,47	ns
Chol.	VLDL	1 mit 2	1,33	22,60	ns
Chol.	VLDL	1 mit 3	0,79	46,29	ns
Chol.	VLDL	2 mit 3			ns
Chol.	LDL	1 mit 2	0,31	76,91	ns
Chol.	LDL	1 mit 3	1,25	26,77	ns
Chol.	LDL	2 mit 3			ns
Chol.	HDL	1 mit 2	1,64	14,55	ns
Chol.	HDL	1 mit 3	0,23	82,58	ns
Chol.	HDL	2 mit 3	2,50	5,44	ns
Tgl.	Ges.	1 mit 2	0,27	79,15	ns
Tgl.	Ges.	1 mit 3	1,23	26,43	ns
Tgl.	Ges.	2 mit 3	1,59	17,29	ns
Tgl.	VLDL	1 mit 2	0,67	52,64	ns
Tgl.	VLDL	1 mit 3	0,98	37,34	ns
Tgl.	VLDL	2 mit 3			ns
Tgl.	LDL	1 mit 2	0,24	81,37	ns
Tgl.	LDL	1 mit 3	1,26	26,37	ns
Tgl.	LDL	2 mit 3			ns
Tgl.	HDL	1 mit 2	0,01	99,28	ns
Tgl.	HDL	1 mit 3	2,25	11,00	ns
Tgl.	HDL	2 mit 3	0,95	38,48	ns
Phos.	Ges.	1 mit 2	2,29	5,59	ns
Phos.	Ges.	1 mit 3	0,90	40,05	ns
Phos.	Ges.	2 mit 3	1,66	15,70	ns
Phos.	VLDL	1 mit 2	1,24	25,39	ns
Phos.	VLDL	1 mit 3	0,50	63,57	ns
Phos.	VLDL	2 mit 3			ns
Phos.	LDL	1 mit 2	1,00	39,19	ns
Phos.	LDL	1 mit 3	1,00	42,25	ns
Phos.	LDL	2 mit 3			ns
Phos.	HDL	1 mit 2	1,89	15,48	ns
Phos.	HDL	1 mit 3	2,34	5,75	ns
Phos.	HDL	2 mit 3	0,17	87,27	ns

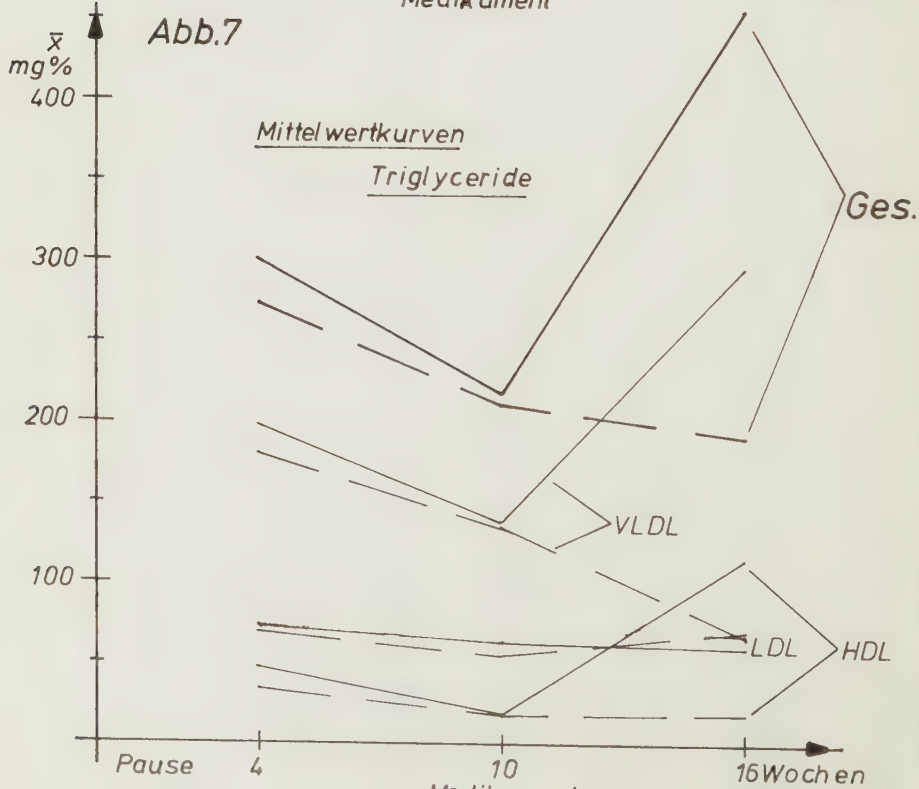
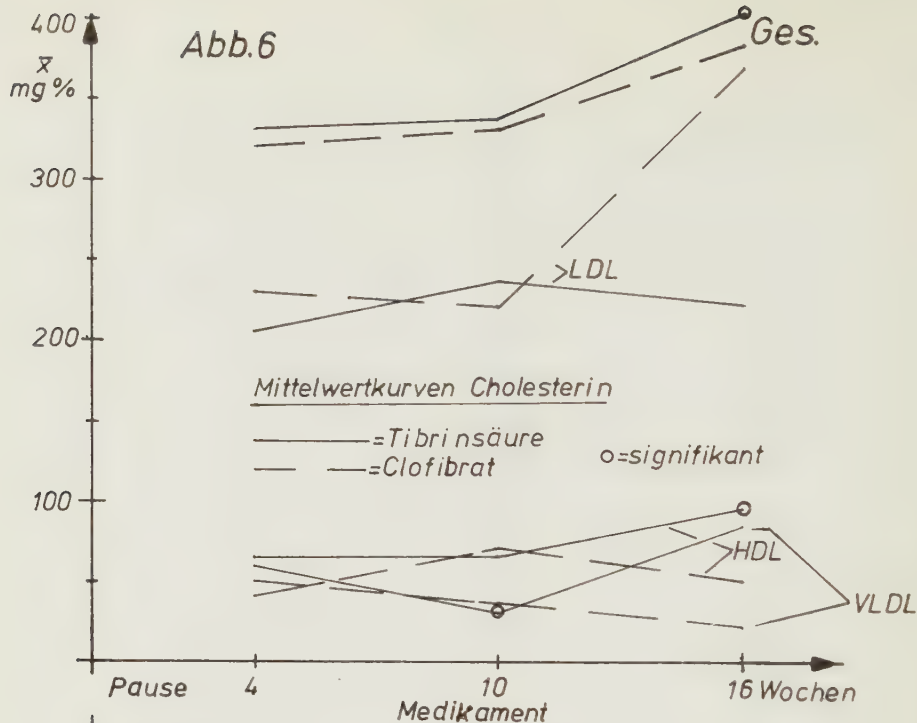
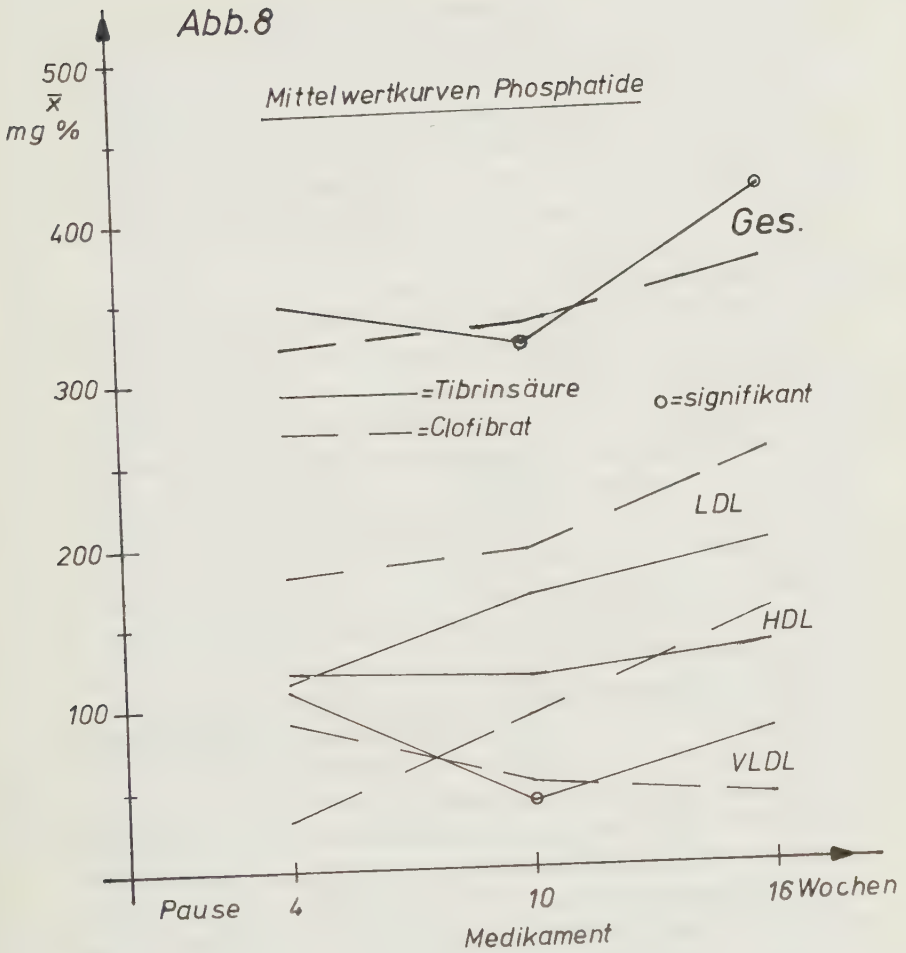


Abb. 8



D. Diskussion

Die Hyperlipoproteinämien werden in erster Linie behandelt, um das Risiko der koronaren Herzerkrankungen zu senken. Nachdem nun das Coronary Drug Project (12) keine Verringerung der Mortalität bei Patienten, die nach einem erlittenen Myocardinfarkt mit Clofibrat, Nikotinsäure, D-Thyroxin oder Östrogenen behandelt wurden, feststellen konnte, werden die Lipidsenker erneut diskutiert, nachdem sich schon zahlreiche Studien mit recht unterschiedlichen Ergebnissen damit befaßt hatten. (16, 40, 6, 14, 15)

Wir untersuchten an je fünf Patienten mit Hypercholesterinämie (FREDRICKSON Typ II a und b) die Wirkung von Clofibrat und Tibrinsäure. Trotz nicht signifikanter Ergebnisse sind doch Tendenzen erkennbar (vgl. Abb. 6, 7 und 8, S. 30 und 31).

Während bei den von uns untersuchten Patienten der Gesamtcholesterin- sowie Phosphatidspiegel bei Medikation mit Clofibrat oder Tibrinsäure anstieg, sank lediglich der Gesamttriglyceridspiegel bei Medikation mit Clofibrat signifikant und Cholesterin und Phosphatide bei Medikation mit Tibrinsäure.

Von GOTTO (14) wurde dieser Effekt von Clofibrat beschrieben und es gilt deshalb als Hauptlipidsenker bei endogener Hypertriglyceridämie (FREDRICKSON Typ III).

Betrachtet man jedoch die Mittelwertkurven der einzelnen LP-Fractionen (Abb. 6, 7 und 8), so erkennt man deutlich die gegenläufige Tendenz der VLDL und LDL.

STRISOVER et al. (50) veröffentlichten schon im Jahre 1968 eine Studie, in der sie mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge feststellten, daß die LDL unter Clofibratbehandlung bei HLP Typ IV stark anstiegen, die VLDL gleichzeitig abnahmen. Auch CARLSON (9) beschreibt 1974 ähnliche Wirkungsmechanismen und vergleicht sie mit der Untersuchung von STRISOVER et al. (1970) (siehe 9).

STRISOVER fand bei 14 Patienten Typ II a keine Veränderung der LDL, vermerkte aber ein Absinken der VLDL um 35 %; bei 5 Patienten Typ II b verringerte sich der LDL-Anteil um 30 % oder erhöhte sich um 32 %, während der Anteil der VLDL um 57 % abnahm. CARLSON (9) fand auch bei anderen Lipidsenkern reziproke Verhaltensweisen der VLDL und LDL.

ROSE et al. (42) veröffentlichten erst jüngst eine Arbeit, in der sie feststellten, daß Clofibrat besonders bei Patienten mit HLP Typ IV die LDL stark erhöht (+ 37,6 %). Bei Patienten mit HLP Typ II b hatte Clofibrat keinen Effekt auf die LDL.

Die Plasma LDL- und HDL-Konzentrationen werden von Clofibrat gesenkt, bleiben unverändert oder steigen (50, 36).

Der Mechanismus des gegenläufigen Verhaltens von VLDL und LDL ist noch nicht genau bekannt. Zur Zeit wird angenommen, daß die LDL ganz oder zu einem großen Teil das Endprodukt des VLDL Katabolismus sind (42). Diese reziproke Verwandtschaft besteht jedoch nicht während des Alterns; wie Populationsstudien gezeigt haben, steigen sowohl die VLDL als auch die LDL parallel an (43). Ebenso werden beide Lipoproteine durch Behandlung mit Nikotinsäure verringert (11).

Die wenigen Untersuchungen über die Wirkung der Fibrinsäure zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Die uns bekannten Untersuchungen beschränken sich dabei auf die Veränderung der Gesamtcholesterin- bzw. Triglyceridwerte.

NOSEDA (38) konnte keine signifikante Änderung der Lipidwerte bei fünf Patienten mit HLP Typ II b verzeichnen. Bei vier Fällen mit Typ II a konnten die Cholesterinwerte signifikant gesenkt werden.

GROSS et al. (23) erreichten nach einem Jahr bei 23 Patienten mit HLP Typ IV und einem Patienten Typ II b durch Behandlung mit Fibrinsäure eine durchschnittliche Senkung der Triglyceridkonzentration von 23 %, der Cholesterinkonzentration von 12 %.

SALVIOLO et al. (46) beschreiben ebenso eine signifikante Senkung der Serumcholesterin- und Triglyceridspiegel durch Fibrinsäure bei Patienten mit HLP Typ IV, II a und b sowie Typ V, während BIELMANN (5) nur eine deutliche Senkung des TGL-Spiegels (- 30 %), weniger des Cholesterinspiegels (- 5 %), bei Patienten mit HLP Typ IV beobachtete.

In unserer Untersuchung konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden.

Der Vergleich der Mittelwertkurven (Abb. 6, 7 und 8) zeigt jedoch, daß zwischen beiden Medikamenten kaum ein Unterschied besteht. Clofibrat lediglich scheint eine bessere Wirkung auf die Triglyceride zu haben.

Die lange Zeit vernachlässigten HDL haben durch die Publikationen von MILLER (37), CAREW (8) und STEIN (49) für die Behandlung der HLP

großes Interesse gefunden. Hohe Plasma HDL-Konzentrationen wird ein präventiver Effekt zur Arteriose zugeschrieben, da sie die LDL am Eintritt in die Gefäßwand hindern sollen sowie den Abtransport von Cholesterin aus den glatten Muskelzellen der Arterienwände durchführen.

In diesem Zusammenhang wird ein möglicher Vorteil der Fibrinsäure gegenüber Clofibrat gesehen, da sie in unserer Untersuchung generell die HDL-Konzentration erhöht.

E. Zusammenfassung

1. Es wurden die qualitativen Wirkungen des Standardtherapeutikums Clofibrinsäure und seines Derivats Fibrinsäure auf die verschiedenen Lipoproteinklassen bei Patienten mit Hypercholesterinämie (FREDRICKSON Typ II a und II b) über einen Zeitraum von 12 Wochen untersucht.
2. Die verschiedenen Lipoproteinklassen wurden durch die UZ isoliert; in den VLDL, LDL und HDL wurden die Lipidkonzentrationen (Cholesterin, Triglyceride, Phosphatide) bestimmt.
3. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Die erkennbaren Tendenzen, gegenläufiges Verhalten von VLDL und LDL, Erhöhung von HDL-Lipiden unter lipidsenkender Medikation, wurden in Verbindung gebracht mit den heutigen Anschauungen über die Interconversion der verschiedenen Proteinklassen.
4. Im Grunde sind die qualitativen Veränderungen von Clofibrinsäure und Fibrinsäure enttäuschend, so daß wohl neue therapeutische Ansätze notwendig werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrink, M.J.
Man, E.B. Serumtriglycerides in coronary artery disease
Arch. intern. Med. 103, 4 (1959)
2. Allen, R.J.L. The estimation of phosphorus
Biochem. J. 34, 858 (1940)
3. Bartlett, J.R. Phosphorus assay in Columnchromatography
J. biol. Chem. 234, 466 (1959)
4. Bergmeyer, H.K. Methoden der enzymatischen Analyse
mod. nach 3. Auflage Bd. II, Verlag Chemie,
Wahlefeld, A.W. Weinheim 1974, S. 1878
5. Biellmann, P. Dose-response to tibrac acid: A new
Annable, L.; Brun, D. hypolipidemic drug in type IV hyper-
Moorjani, S. lipoproteinemia
Lupien, P.-J. Clin. Pharmacol. Therapeutics, 17,
Tétreault, L. 606 - 611 (1975)
6. Braunsteiner, H. Langzeitbehandlung von bisher therapiere-
Herbst, M. fraktären Fällen primärer Hypertriglycerid-
Sandhofer, F. ämie des Erwachsenen mit Äthyl-p-Chlorophen-
Sailer, S. oxyisobutyrat
Dtsch. med. Wschr., 92, 2302 - 2308 (1967)
7. Brown, D.F. Serum Triglycerides in Health and Ischemic
Kinch, S.H. Heart Disease
Doyle, J.T. New Engl. J. Med. 273, 947 (1965)
8. Carew, T.E. A Mechanism by which high-density-Lipo-
Koschinsky, T. proteins may slow the atherogenic process
Hayes, S.B. The Lancet, 1315 (1976)
Steinberg, D.
9. Carlson, L.A. Effects of Hypolipidemic Regimes on
Olsson, A.G. Serum Lipoproteins
Orö, L.; Rössner, S. in: Atherosclerosis III, Springer (1974)
Walldin, G. Ed.: Schettler, G. und Weizel, A. S. 768
10. Carlson, L.A. Ischemic heart disease in relation to
Böttiger, L.A. fasting values of plasma triglyceride and
cholesterol
The Lancet, 1, 1323 (1962)

11. Carlson, L.A.; Orö, L. Effect of nicotinic acid on plasma lipids in patients with hyperlipoproteinemia during the first week of treatment
J. Atheroscler. Res., 8, 667 - 677 (1968)
12. The Coronary Drug Project
Research Group Clofibrate and niacin in coronary heart disease
JAMA 231, 360 (1975)
13. The Coronary Drug Project
Research Group Circulation
3, 47 (1973)
14. Gotto, A.M.Jr. Hyperlipoproteinemia
Current Therapie/Conn, 418 - 427 (1974)
15. Craig, G.M. A comparison of Clofibrate and its derivate Methyl Clofenapate
Atherosclerosis, 15, 265 - 271 (1972)
16. Ditzel, J. Clofibrate in type II hyperlipoproteinemia
Bang, H.O. Acta Med. Scand., 200, 55 - 58 (1976)
17. Eggstein, M. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe
Klin. Wschr. 44, 267, (1966)
18. Eggstein, M. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe
Kreutz, F.H. Klin. Wschr. 44, 262 (1966)
19. Folch, J.; Lees, M. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
Sloane-Standley, D.H.
20. Fredrickson, D.S. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders
Leoy, R.J. New Engl. J. Med. 276, 32, 94, 148, 215, 273 (1967)
Lees, R.S.
21. Gofman, J.W. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum
Lindgren, F.T. J. biol. Chem. 179, 973 (1949)
Elliot, H.
22. Gofman, J.W. Serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery disease
DeLalla, O.F. Plasma (Milano) 2, 413 (1954)
Glazier, F.
Freeman, N.
Lindgren, F.
Nichols, A.
Strisover, B.
Tamplin, A.

23. Gross, R.C. Influence of tibric acid on human
Cornell, R.C. hyperlipidemia
Pool, P.E. V. International Symposium On Drugs
 Affecting Lipid Metabolism, Milano 1974, S.56
24. Havel, R.J. The distribution and chemical composition
Eder, H.A. of ultracentrifugally seperated lipoproteins
Bragdon, J.H. in human serum
 J. clin. Invest. 34, 1345 - 1363 (1955)
25. Hellmann, L. Reduction of cholesterol and lipids in man
Zumoff, B. by ethyl-p-p-chlorophenoxy-isobutyrate
Kessler, G.; Kara, E. Ann. Intern. Med. 59, 477 (1963)
Rubin, J.L.
Rosenfeld, R.S.
26. Howard, R.P. Effects of ethylchlorophenoxyisobutyrate,
Alanovic, P. alone or with androsterone (Atromid) on serum
Brusco, O.J. lipids, lipoproteins and related metabolic
Furman, R.H. parameters in normal and hyperlipidemic
 subjects
 J. Atheroscler. Res. 3, 482 (1963)
27. Jurand, J. The effects of ethylchlorophenoxyisobutyrate
Oliver, M.F. on serum cholesterol, triglyceride and
 phospholipid fatty acids
 J. Atheroscler. Res. 3, 547 (1963)
28. Kaffarnik, H. Störungen des Fettstoffwechsels
Schneider, J. Dt. Ärzte-Verlag Fach-Taschenbuch Nr. 18
Nolte, R. S. 32
29. Kannel, W.B. Serum cholesterol, lipoproteins, the risk
Castelli, W.P. of coronary-heart-disease
Gordon, T. Framingham-Study Ann. intern. Med. 74, 1
McNamara, P.M. (1971)
30. Kannel, W.B. Gefährdung durch koronare Herzkrankheiten
Widmer, L.K. Schweiz. med. Wschr. 95, 18 (1965)
Dawber, T.R.
31. Kannel, W.B. Result of the epidemiologic investigation
 of ischemic heart disease, illustrated by
 the Framingham study
 in: Snellen, H.A., Ed. Boerhave Course on
 ischemic heart disease, 272, (1969) Leiden,
 Netherlands

32. Klemens, U.H.
Schmalbeck, J.
Heidrich, E. Qualitativer Vergleich der Lipoprotein-
Elektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen
mit der Fraktionierung von Lipoproteinen
in der präparativen Ultrazentrifuge
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8,
162 - 165 (1970)
33. DeLalla, O.F.
Gofman, J.W. Ultracentrifugal analysis of serum lipopro-
teins
in: Methods of biochemical analysis,
Ed. D. Glick, S. 459 Interscience New York
(1954)
34. Langer, T.
Levy, R.J. Acute muscular syndrome associated with
administration of Clofibrate
N. Engl. J. Med. 279, 856 (1968)
35. Lees, R.S.
Wilson, D.E. The treatment of hyperlipidemia
N. Engl. J. Med. 4, 186 - 195 (1971)
36. Lees, R.S.
Wilson, D.E. Reciprocity of plasma low and very low
density lipoprotein concentrations in
lipemia
J. Clin. Invest. 49, 56 a (1970)
37. Miller, G.J.
Miller, N.E. Plasma-high density-lipoprotein concentration
and development of ischaemic heart-disease
The Lancet, 16 (1975)
38. Nosedà, G.
Sirtori, C.R. Klinische Prüfung von "Tibric Acid" einem
neuen lipisenkenden Stoff
Schweiz. med. Wschr. 104, 1917 - 1922 (1974)
39. Oliver, M.F. Reduction of serum-lipid and uric acid levels
by an orally active androsterone
The Lancet 1: 1321 (1962)
40. Olsson, A.G.
Orö, L.
Rössner, S. Dose-response effect of single and combined
Clofibrate and niceritol treatment on serum
lipids and lipoproteins in type II hyperlipo-
proteinemia
Atherosclerosis , 22, 91 - 101 (1975)
41. Röschlau, P.
Bernt, E.
Gruber, W. Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Choleste-
rins im Serum
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 12, 403 - 407
(1974)

42. Rose, H.G.
Haft, G.K.
Juliano, J. Clofibrate induced low-density lipoprotein elevation. Therapeutic implications and treatment by Colestipol resin
Atherosclerosis, 23, 413 - 427 (1976)
43. Sachs, B.A.
Wolfman, L. Response of hyperlipoproteinemia to Colestipol
N. Y. State J. Med. 73, 1068 - 1070 (1973)
44. Sachs, L. Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag Berlin 1969, S. 309 - 311
45. Sachs, L. Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag Berlin 1969, S. 269
46. Salvioli, G.F.
Lugli, R.
Baldelli, M.V. Pharmacokinetic and clinical study of a new hypolipemic agent
V. International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, Milano 1974, S. 92
47. Schmidt, F.H.
von Dahl, K. Zur Methode der enzymatischen Neutralfett-Bestimmung in biologischem Material
Z. Klin. Chem. 6, 156 (1968)
48. Schneider, J.
Kaffarnik, H. Impotence in patients treated with clofibrate
Atherosclerosis, 21, 455 - 457, (1975)
49. Stein, O.
Stein, Y. High density lipoproteins reduce the uptake of low density lipoproteins by human endothelial cells in culture
Biochemica et Biophysica Acta, 431, 363 - 368 (1976)
50. Strisover, E.H.
Adamson, G.
Strisover, B. Treatment of hyperlipidemias
Am. J. Med. 45, 488 - 501 (1968)
51. Thorp, J.M. Experimental evaluation of an orally active combination of androsterone with ethylchlorophenoxyisobutyrate
The Lancet 1, 1323 (1962)
52. Undeutsch, D.
Gries, F.A.
Klemens, U.H.
Vogelberg, K.H.
Wolfram, G. Fettstoffwechselstörungen
Kap. 9, S. 121 - 143, Editiones "Roche" 1974 by Hoffmann-La Roche AG, Grenzach

53. WHO Memorandum Circulation
 45, 501 (1972)
54. Yeshurun, D. Drug treatment of hyperlipidemia
 Gotto jr., A.M. Am. J. Med. 60, 379 - 396 (1976)
55. Zöllner, N. Die säulenchromatographische Trennung der
 Kirsch, K. Plasmalipoproteide
 I. Mitteilung: Methodik und Identifizierung
 der Fraktionen
 Z. ges. exp. Med. 134, 1028 (1960)

Den Herren Professoren Dr. Klaus und Dr. Kaffarnik gilt mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. med. habil. Jürgen Schneider für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse möchte ich Herrn Diplom-Mathematiker P. Zöfel vom Rechenzentrum der Universität danken.

Außerdem danke ich Fräulein Karin Straube für die Schreibarbeiten.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Bernhardt, Bode, Braasch, Castenholz, Dehnicke, Dimroth, Friedrich, Ganz, Golenhofen, Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heuser, Hildebrandt, Hort, Janke, Karlson, Koecke, Kleinsasser, Koransky, Lauer, Maroske, Niemeyer, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rupec, Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Schnell, Schulte-Herrmann, Seidel, Walcher, Wehrmeyer, Wesemann, Wiegandt.

LEBENS LAUF

Ich, Jürgen Bätcher, wurde am 30. März 1946 als erstes von vier Kindern des Fliegermajors a.D. Hansgeorg Bätcher und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Nünning, in Göppingen/Baden-Württemberg geboren.

Von 1952 - 1955 besuchte ich die Volksschule in Eßlingen/Neckar und nach unserem Umzug die 11. Grundschule in Berlin-Lichtenrade. Ab Ostern 1958 besuchte ich den neusprachlichen Zug der Ulrich-von-Hutten-Schule in Berlin-Lichtenrade, wo ich am 23. Februar 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Studium von 3 Semestern Jura und 4 Semestern Betriebswirtschaft an der Freien Universität Berlin sowie einem Semester Betriebswirtschaft in Göttingen, konnte ich endlich zum Sommersemester 1970 das Studium der Zahnheilkunde in Marburg aufnehmen. Im Frühjahr 1971 legte ich die naturwissenschaftliche und im Sommer 1972 die zahnärztliche Vorprüfung ab. Am 22. Juli 1975 bestand ich das zahnärztliche Staatsexamen.

Seit dem 1. September 1975 bin ich als Assistent in der kassenzahnärztlichen Praxis des Herrn Dr. med. dent. Dirk Salamon in Westerbürg/Oberwesterwald tätig.

Westerbürg, den 6. April 1977

Jürgen Bätcher

